

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15504

研究課題名(和文) 間葉系ストローマ細胞の細胞分裂制御による機能的人工骨髄ニッチ構築

研究課題名(英文) Reconstitution of functional artificial bone marrow niche via induction of mesenchymal stromal cell division

研究代表者

滝澤 仁 (Takizawa, Hitoshi)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘准教授

研究者番号：10630866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：血の源である造血幹細胞は骨を作る間葉系ストローマ細胞などのニッチと言われる微小環境で様々な液性因子の調節を受けて骨髄で維持される。本研究ではヒト骨髄の間葉系ストローマ細胞を用いて免疫不全マウスの中でヒト造血幹細胞を機能的に維持できる人工骨髄ニッチを作出した。この成果は試験管内で造血幹細胞を増幅できる人工骨髄ニッチ創出へとつながる成果といえる。

研究成果の概要(英文)：Blood forming hematopoietic stem cells (HSCs) are maintained within bone marrow microenvironment, often called niche consisting of bone forming mesenchymal stromal cells (MSC) that secrete various factors. here, we have successfully generated an artificial HSCs human bone marrow niche by engrafting human MSCs into mice that can maintain functional human HSCs.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

生涯造血を担う骨髄には、血液の源となる造血幹細胞(HSC)の他に、非血液細胞が共存し、HSCの自己複製能と多分化能の維持に関与している。それら骨髄ニッチ細胞の一つ、間葉系ストローマ細胞(MSC)は、試験管内で細胞極性をもって自己複製しつつ、他の骨髄ニッチ細胞への分化能を維持する。その特殊な細胞特性をもつMSCが組織修復や移植制御などの再生医療に有用な細胞ソースとして注目される一方、特異的マーカー及び生体内での細胞機能解析系の欠如から、MSCの細胞階層性、自己複製能および分化能の分子基盤は明らかとなっていない。

代表者らはこれまで、ヒト正常骨髄より初代培養した間葉系ストローマ細胞(MSC)を試験管内分化誘導し、免疫不全マウスへ移植することにより、造血幹細胞の造血能を維持できるヒト化骨髄の構築に成功した(Scotti C, PNAS 2013、Rongvaux A, Ann. Rev. Immunol 2013)。さらに代表者らの最新知見より、ヒトMSCからヒト化骨髄への分化効率は骨髄ドナーまたは培養期間によって顕著に異なる手がかりを得ていた。

2. 研究の目的

本研究では、代表者らが確立した上述のヒト化骨髄構築技術と連携研究者、新井らが開発したpaired daughter assayによる自己複製評価系を組み合わせ、MSC前駆細胞の純化、その細胞分裂極性と自己複製・分化能の関係性、自己複製を制御する細胞内シグナル解析を通して、MSC前駆細胞特性を理解する。さらに、MSC-MSC細胞間結合の強弱が造血幹細胞の機能に影響することから(A Schajnovitz, Nat Immunol 2011)、MSC前駆細胞の細胞分裂を人為的に修飾することで自己複製・分化能を制御し、HSC自己複製能を誘導できる人工骨髄ニッチ創出を目指した。

3. 研究の方法

目的1) 細胞表面マーカーと骨髄再構築評価系の併用によるMSC前駆細胞の純化と分化階層性の決定

代表者らはヒト正常骨髄由来間葉系ストローマ細胞(MSC)をコラーゲン上で試験管内分化誘導し、免疫不全マウス皮下で再構築したヒト化骨髄が臍帯血由来造血幹細胞(Lin-CD34-CD38+CD90+CD45RA-)を維持できる予備的データを既に得ていた。この結果は、ドナー骨髄に存在する生物学的個体差を示唆しており、骨髄に存在するMSC前駆細胞の頻度または自己複製能・分化能に由来すると考えられた。これまで報告のある細胞表面マーカー(CD271,CD146,CD51,CD105、SSEA-1など)(FJ Lv, Stem Cells 2014)と新規候補マーカー(Itga8,Cdh2,Alcam)を用いて、各ドナー骨髄細胞の免疫表現型を比較解析した。高い骨髄再構築能をもつドナーに多く存在する細胞分画をMSC前駆細胞の候補分画として分離し、ポピュレーションまたはシングルセルレベルで免疫不全マウスに移植して骨髄再構築能を評価した。

目的2) シングルセル解析によるMSC細胞分裂極性と自己複製能の関係

目的1)で同定されるMSC前駆細胞をシングルセルで培養し、1回分裂した際の娘細胞を回収し(Paired daughter cell assayおよび図2)、目的1)で発現のみられるMSC前駆細胞に特異的遺伝子群のうち、上位高発現遺伝子群および自己複製能・骨髄ニッチ細胞への分化能に関与する可能性のある遺伝子群についてシングルセルqPCR(Fluidigm)を行う。その結果について、連携研究者の新井とA. MacArthurが造血幹細胞について既に確立している機械学習法を取り入れた数理解析を行い、対称性(前駆細胞-前駆細胞ペア)または非対称性分裂(前駆細胞-分化細胞ペア、または分化細胞-分化細胞ペア)

を識別する遺伝子発現パターンを探る。前駆細胞と分化細胞を区別する遺伝子パターンのうち、細胞分裂動態(細胞骨格、細胞周期、モーター蛋白質など)、エピジェネティクスなどの関連遺伝子群に着目し、自己複製分裂時の候補タンパク質の細胞内動態を経時的に追跡することで、自己複製と分化を制御するシグナル変化を同定する。

4. 研究成果

目的1) 代表者らはヒト正常骨髄由来間葉系ストローマ細胞(MSC)をコラーゲン上で試験管内で軟骨分化へと分化誘導し、免疫不全マウス皮下でヒト様骨髄(ヒト化骨髄)を再構築した(Scotti, PNAS 2013)。この論文ではヒト化骨髄がマウス造血幹細胞を呼び寄せ、その造血能を維持できることを示したが、ヒト造血幹細胞の造血能維持については検討しなかった。そこで、ヒト化骨髄を生着させた免疫不全マウスに臍帯血由来造血幹細胞を含む分画(Lin-CD34+)を移植した。移植後8週間後に、マウス骨髄またはヒト化骨髄を解析したところ、ヒト化骨髄はマウス骨髄に比して造血幹細胞分画(Lin-CD34-CD38+CD90+CD45RA-)を高く維持することが明らかとなった。さらに、造血幹細胞の細胞周期を解析した結果、ヒト化骨髄は造血幹細胞や前駆細胞を高い頻度で静止期に留めておくことができることが明らかとなった。

連携病院から採取した正常骨髄からMSCを培養し、それを用いて軟骨分化誘導をおこなった。その結果、全ドナー(2018年4月時点で約300例以上)のうち、約30%程度のドナーのみ軟骨分化能を示すことが分かった。つまり、MSCの分化能はドナーによって大きく異なること、またその一部のみが骨髄組織を再構築できることを示唆している。骨髄組織の形成能をもつMSCを純化するために、これまで報告のある細胞表面

マーカー(CD271,CD146,CD51,CD105、SSEA-1など)(FJ Lv, Stem Cells 2014)をFACS解析した。そして、候補細胞をソーティングして、試験管内CFU Fibroblast(CFU-F)の数で評価したところ、CFU-Fを持つ細胞がCD45-CD31-GPA-CD271+の分画に検出できた。そこで、CD45-CD31-GPA-CD271+またはCD45-CD31-GPA-CD271-の分画をソーティングしてRNA-seqを行なった結果、いくつかの興味深い遺伝子群が同定できた。今後はこれらの候補遺伝子群を指標に、細胞分画を進め、造血形成能をもつMSCの純化を進めていく。

目的2) MSC純化が50%濃縮程度に達した段階で、シングルセルレベルでの自己複製能解析を進める。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] 査読あり(計1件)

Fritsch K, Pigeot S, Bourguin PE, Feng X, Schroeder T, Martin I, Manz MG, Takizawa H, Engineered humanized bone organs maintain human hematopoiesis in vivo, *Exp Hematol*, 2018 May;61:45-51.e5. doi: 10.1016/j.exphem.2018.01.004.

[学会発表](計4件)

Xiaomin Feng, Kristin Fritsch, Yuichiro Arima, Koichi Nishiyama, Markus G. Manz, Hitoshi Takizawa, Reconstitution of human bone marrow niche for better maintenance of human hematopoiesis in vivo, 2nd IRCMS symposium, 2016年10月31日、熊本

Xiaomin Feng, Hitoshi Takizawa, “Prospective Isolation of Human Mesenchymal Stromal Cell Progenitor” 日本免疫学会、2016年12月7日、沖縄

Xiaomin Feng, Kristin Fritsch, Sébastien Pigeot, Yuichiro Arima, Koichi Nishiyama, Ivan Martin, Markus G. Manz, Hitoshi Takizawa, “Humanization of bone marrow niche for better maintenance of human hematopoiesis in xenograft model”, 日本血液学会、2017年10月12-14日、東京

Hitoshi Takizawa, 2nd Symposium JSPS and NUS Joint Symposium “New Horizon In Normal and Cancer Stem Cell Research” Jan/18-20th/2018, Kumamoto, Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/research/hitoshi_takizawa/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

滝澤 仁 (Hitoshi Takizawa)

熊本大学国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号：10630866

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

新井 文用 (Fumio Arai)

九州大学医学研究院・教授

研究者番号：90365403

横川 隆司 (Ryuji Yokokawa)

京都大学工学研究科・准教授

研究者番号：10411216

(4)研究協力者

()